



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 56 703 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:  
**G 01 N 33/543**

②① Aktenzeichen: 198 56 703.0  
②② Anmeldetag: 9. 12. 1998  
④③ Offenlegungstag: 6. 7. 2000

4)

DE 198 56 703 A 1

⑦① Anmelder:  
Deutsches Rotes Kreuz Blutspendedienst  
Baden-Württemberg, Gemeinnützige GmbH, 76530  
Baden-Baden, DE

⑦④ Vertreter:  
Mierswa, K., Dipl.-Ing., Pat.- u. Rechtsanw., 68199  
Mannheim

⑦② Erfinder:  
Spindler, Jörg, 69126 Heidelberg, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:

DE	43 13 603 A1
US	55 12 432 A
US	53 38 689 A
EP	07 25 276 A1
EP	05 04 797 A2
EP	01 94 212 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in einer Testflüssigkeit mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei das Antigen bzw. der Antikörper oder der spezifische Bindungspartner an einen Träger gebunden ist und wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus Antigenen bzw. Antikörpern, den entsprechenden Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch detektierbar ist. Erfindungsgemäß wird ein Mikroreaktionsgefäß mit einem sich von oben nach unten verjüngendem Querschnitt verwendet, welches eine viskose Substanz, insbesondere Gel oder eine Suspension bzw. Dispersion inerte Partikel, enthält. Ein vorbestimmtes Volumen der Testflüssigkeit wird dem Gefäß zugefügt, wobei entweder der Testflüssigkeit oder dem Gel bzw. der Suspension der spezifische Bindungspartner zugesetzt wird, oder eine Flüssigkeit, die diesen enthält, nach Zufügen der Testflüssigkeit dem Gefäß zugefügt wird. Schließlich wird, evtl. nach einer Inkubation und/oder Zentrifugation das Sedimentationsbild, optisch ausgewertet, wobei ein flächiges Agglutinat von Antigenen bzw. Antikörpern, Bindungspartnern und Trägern auf eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion hinweist und ein Ablagern von Antigenen bzw. Antikörpern, Bindungspartnern und/oder Trägern im unteren, schmaleren Bereich des Gefäßes auf eine negative Reaktion hinweist. Das Verfahren läßt sich vorteilhaft vollautomatisch ausführen, z. B. unter Verwendung ...

DE 198 56 703 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei das Antigen bzw. der Antikörper oder der spezifische Bindungspartner an einen Träger gebunden ist und wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus Antigenen bzw. Antikörpern, den entsprechenden Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch detektierbar ist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Spitzboden-Mikrotiterplatten zur Durchführung eines Tests zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen durch Detektion einer Agglutinationsreaktion.

Insbesondere menschliche Blutgruppensubstanzen, aber auch eine Vielzahl von anderen in einem Organismus gebildeten Substanzen, werden durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion ist detektierbar über eine Vernetzung, Agglutination, von Antigenen, Antikörpern und bestimmten Träger-substanzen, die Antigen oder Antikörper tragen, zu einem makroskopisch erfassbaren Komplex, dem Agglutinat. Beispiele dafür sind die erythrozytenseitige Blutgruppenbestimmung, bei der an die Membran des Spendererythrozyten gebundenen Blutgruppen-Antigene durch Reaktion mit Antiseren nachgewiesen werden, die Antikörper als spezifische Bindungspartner enthalten, und die Serumgegenprobe, bei welcher körpereigene Antikörper (Isoagglutinine) durch Reaktion mit spezifischen Test-Erythrozyten nachgewiesen werden. Die Agglutination wird unter geeigneten Reaktionsbedingungen durch Reaktion von Antigen und Antikörper auf mikroskopischer Ebene hervorgerufen.

Die Agglutination kann auf verschiedene Weise sichtbar gemacht werden. Ein bisher bekanntes Verfahren zur Blutgruppenbestimmung verwendet beispielsweise Rundboden-Mikrotiterplatten, wobei in die Vertiefungen der Platte eine Serie von verschiedenen Antiseren, die spezifische Antikörper als spezifische Bindungspartner für die Antigene auf der Erythrozytenmembran enthalten, einpipettiert und mit einer Testflüssigkeit versetzt wird, welche die zu testenden Erythrozyten in verdünnter Form enthält. Nach einer Inkubationszeit wird die Platte anzentrifugiert und anschließend vorsichtig aufgeschüttelt. Bei einer positiven Antigen-Antikörper-Reaktion haben sich die Erythrozyten zu einem Klumpen agglutiniert, der sich durch den Zentrifugierschritt in der Mitte der Vertiefung ansammelt und durch das Aufschütteln möglichst nicht zerstört wird. Eine positive Reaktion ist demnach als eine punkt- oder knopfförmige Erythrozytenansammlung in der Mitte einer Vertiefung optisch zu detektieren. Demgegenüber besteht bei einer negativen Antigen-Antikörper-Reaktion, d. h. nicht erfolgter Agglutination, keine Verbindung zwischen den Erythrozyten. Die nach dem Zentrifugierschritt in der Vertiefungsmitte angesammelten Erythrozyten verteilen sich demnach durch das Aufschütteln über einen Großteil des U-förmigen Vertiefungsbodens. Eine negative Reaktion ist somit durch einen flächigen, über den Boden der Vertiefung ausgedehnten Erythrozytenfleck optisch detektierbar.

Dieses Verfahren ist jedoch nur aufwendig automatisierbar. Zum einen ist ein Zentrifugier- und ein Aufschüttelungsschritt technisch sehr aufwendig zu realisieren. Zum anderen hängt die Zuverlässigkeit der Detektion einer positiven Reaktion von der Stärke der Antikörper-Antigen-Bindung ab: Bei schwachen Bindungen kann der agglutinierte Erythrozytenklumpen durch äußere Störungen, insbesondere durch das Aufschütteln, wieder getrennt und somit fälschlich als negative Reaktion diagnostiziert werden. Aus

diesem Grunde ist wegen des eventuell fehlenden klaren Sedimentationsbildes auch die automatische Unterscheidung zwischen positiver und negativer Reaktion, z. B. mittels automatischer photometrischer Auswertung, nicht ohne weiteres möglich, sondern muß von einer erfahrenen Bedienperson vorgenommen oder zumindest überprüft werden. Schließlich sind die Reaktionsbilder nicht stabil, da sich die Trägererythrozyten mit und ohne Agglutination stets an der tiefsten Stelle des Reaktionsgefäßes ansammeln. Damit ist keine zuverlässige Überprüfung des Reaktionsergebnisses möglich.

Ein weiteres Verfahren verwendet zur Detektion von Antikörper-Antigen-Reaktionen speziell präparierte Mikrotiterplatten, bei denen in den V-förmigen Boden der einzelnen Vertiefungen einen treppenförmige Struktur eingefräst ist. Die Breite der einzelnen Treppen liegt in der Größenordnung von einigen Mikrometern. In den Vertiefungen der Platte werden zur Durchführung einer Blutgruppenbestimmung in bekannter Weise Antiseren bzw. Testerythrozytenlösungen mit Erythrozyten- bzw. Blutserumsproben zur Reaktion gebracht und nach einer Inkubation bei Temperaturen von etwa 30°C ausgewertet. Findet in einer Vertiefung keine Antikörper-Antigen-Reaktion statt, so sammeln sich die (Test-)Erythrozyten, die hier die Träger von Antigenen sind, in der Mitte der V-förmigen Vertiefung und sind als punkt- oder knopfförmiges Sediment detektierbar. Bei einer positiven Reaktion vernetzen jedoch die Erythrozyten und bilden ein flächig agglutiniertes Gebilde, das durch die treppenförmige Struktur gehalten wird. Dieselbe Reaktion in einer V-Boden-Mikrotiterplatte ohne Treppenstruktur würde zu einem Erythrozytenklumpen in der Vertiefungsmitte führen und wäre somit nicht von einer negativen Reaktion unterscheidbar. In diesem Fall ist eine positive Reaktion aufgrund der treppenförmigen Struktur jedoch als flächiger, über den Boden der Vertiefung ausgedehnter "Teppich" aus agglutinierten Erythrozyten optisch detektierbar.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß es als klassische Sedimentationsmethode, bei welcher keine zusätzlichen mechanischen Eingriffe, wie Zentrifugieren, notwendig sind, gut automatisierbar ist. Weiterhin ist auch die Auswertung aufgrund klarer Sedimentationsbilder, die gegenüber mechanischen Störungen relativ stabil sind, automatisiert photometrisch oder mit einer Videokamera möglich. Problematisch ist hingegen der hohe Aufwand zur Herstellung der betreffenden Mikrotiterplatten durch Einfräsen der Treppenstruktur. Aus diesem Grunde liegen die Preise der Mikrotiterplatten so hoch, daß eine einmalige Verwendung wirtschaftlich nicht tragbar ist. Zum Mehrwegbetrieb hingegen sind aufwendige Reinigungs- und Sterilisationsschritte notwendig, um keine verfälschten Ergebnisse zu erhalten. Weiterhin ist die Lebensdauer der Mikrotiterplatten erfahrungsgemäß auf etwa 50 bis 80 Einsätze begrenzt. Problematisch ist des weiteren die Erfassung von schwach-positiven Reaktionen, bei denen man eine Verweigerungswahrscheinlichkeit von etwa 5% beobachtet. Dies ist besonders bei der Serumgegenprobe zu beobachten, da der individuelle Antikörper (Isoagglutinin)-Titer von Mensch zu Mensch stark variiert.

Zum Nachweis von Antigenen oder Antikörpern sind des weiteren z. B. aus der US 5512432 und US 5338689, Verfahren bekannt, die positive bzw. negative Antigen-Antikörper-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß sichtbar machen, welches eine Dispersion oder Suspension inerte Partikel enthält. Die US 5512432 lehrt eine Methode zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen durch Detektion einer Agglutination auf optischen Weg, wobei in ein Mikroreaktionsgefäß, welches eine Dispersion oder Suspension inerte Partikel und die bekannten, für die nachzuweisenden Antigene

bzw. Antikörper spezifischen Bindungspartner enthält, eine vorbestimmte Menge einer Testflüssigkeit zugefügt wird, die nachzuweisende Antigene bzw. Antikörper an Träger gebunden enthält. Das Gefäß wird zentrifugiert und der Ort optisch ermittelt, an dem sich die Träger ansammeln. Sammeln sich diese oberhalb der Teilchenschicht an, so weist dies auf eine stark positive Antigen-Antikörper-Reaktion hin: Die zu einem Agglutinat vernetzten Träger werden durch die Partikel daran gehindert, gemäß der Zentrifugalkraft auf den Boden des Gefäßes abzusinken. Bei negativer Antigen-Antikörper-Reaktion sinken dagegen die nicht vernetzten Träger auf den Gefäßboden ab. Beide Reaktionsarten können unterschieden werden, indem das Reaktionsgefäß von der Seite betrachtet und die Lage der Träger optisch erfaßt wird. Dazu schlägt die US 5338689 die Verwendung eines transparenten Mikroreaktionsgefäßes vor, wobei eine Mehrzahl solcher Gefäße parallel in Form einer Karte angeordnet sein können und als handliche Einheit Verwendung finden. Auch dieses Verfahren läßt sich jedoch nur umständlich automatisieren, da ein Zentrifugierschritt notwendig ist. Problematisch ist des weiteren die Erfassung von mittleren bis schwachen Antigen-Antikörper-Reaktionen. Bei diesen wird eine ungleichmäßige, flockige Verteilung von Agglutinat über die Füllhöhe der Partikel beobachtet. Diese Reaktionen lassen sich daher nicht zuverlässig automatisch erfassen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, unter Vermeidung der Nachteile des Standes der Technik ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen anzugeben, welches einfach durchführbar und leicht automatisierbar ist sowie zu zuverlässigen Testergebnissen führt.

Die Aufgabe wird bei einem Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei das Antigen bzw. der Antikörper oder der spezifische Bindungspartner an einen Träger gebunden ist und wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus Antigenen bzw. Antikörpern, den entsprechenden Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch detektierbar ist, dadurch gelöst, daß

1.1. ein Mikroreaktionsgefäß mit einem sich von oben nach unten verjüngendem Querschnitt verwendet wird, welches eine viskose Substanz enthält;

1.2. ein vorbestimmtes Volumen der Testflüssigkeit dem Gefäß zugefügt wird, wobei der spezifische Bindungspartner entweder der Testflüssigkeit oder der viskosen Substanz zugesetzt ist, oder eine weitere Flüssigkeit, die den spezifischen Bindungspartner enthält, vor oder nach Zufügen der Testflüssigkeit dem Gefäß zugefügt wird;

1.3. das Sedimentationsbild in Aufsicht etwa von oben oder unten auf das Gefäß ausgewertet wird, wobei ein flächiges Agglutinat von Antigenen bzw. Antikörpern, Bindungspartnern und Trägern auf eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion hinweist und eine räumlich weniger ausgedehnte Ablagerung von Trägern auf eine negative Reaktion hinweist.

Vorteilhafte Weiterbildungen des Verfahrens sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat den großen Vorteil, daß es sich als Sedimentationsverfahren leicht automatisieren läßt. Auf einen Zentrifugationsschritt kann bei der vollautomatischen Durchführung des Verfahrens verzichtet werden. Dieser kann im Einzelfall jedoch unter Umständen vorteilhaft sein zur schnelleren Sichtbarmachung eines Ergebnisses, z. B. um eine Inkubationsphase zu verkürzen.

Des weiteren können als Mikroreaktionsgefäße herkömmliche Mikrotiter-Wegwerfplatten zum Einsatz kommen, die kostengünstig und mit einem Pippettierroboter leicht zu handhaben sind. Diese müssen lediglich vor Durchführung des Verfahrens mit einer viskosen Substanz präpariert werden, welche die Aufgabe hat, eine erfolgte Antigen-Antikörper-Reaktion durch Agglutination der Träger sichtbar zu machen, d. h. die vernetzten Träger in Form eines flächigen optisch erfaßbaren Gebildes ("Teppich" bzw. "Rasen") zu halten. Dagegen sinken unvernetzte Träger gemäß der Schwerkraft an den tiefsten Teil des Gefäßbodens und sammeln sich, da das Gefäß sich verjüngt, zu einem räumlich weniger ausgedehnten, optisch erfaßbaren Gebilde ("Knopf") an.

Bei einer positiven Antigen-Antikörper-Reaktion sammelt sich das Agglutinat je nach Reaktionsbedingungen als Schicht im oberen Bereich der viskosen Substanz, auf dem Gefäßboden oder dazwischen an. Durch die Schicht herabsinkende, aber agglutinierte Träger werden durch die Viskosität der Substanz am weiteren Herabsinken an den tiefsten Punkt des Gefäßbodens gehindert. Wo sich die Schicht bildet, hängt insbesondere von der Viskosität der Substanz, z. B. bei einem Gel von der Gelstärke, und von der Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung ab. Auch schwächere Reaktionen können mit einer entsprechend erhöhten Viskosität nachgewiesen werden, wobei dabei entsprechend lange Sedimentations-/Inkubationszeiten zu veranschlagen sind, bis die Reaktion sichtbar wird. Die Sedimentation aufgrund der natürlichen Schwerkraft kann durch Zentrifugieren verstärkt werden, so daß die Reaktion früher sichtbar wird.

Zur Auswertung mit dem bloßen Auge oder mit einer Video- oder CCD-Kamera durch Aufsicht bzw. Unteransicht auf das Gefäß ist es unerheblich, wo sich die Schicht bildet. Bei photometrischer Auswertung des Sedimentationsbildes ist es jedoch von Vorteil, die Reaktionsbedingungen so zu wählen, daß sich die Schicht am Gefäßboden ablagert. Denn in den anderen Fällen wurde die Ausbildung räumlich inhomogener Schichten beobachtet, die zu verfälschten Meßergebnissen führen können, insbesondere wenn die Länge des Absorptions- oder Transmissionsprofils ausgewertet wird. Die photometrische Auswertung ist unter geringerem technischen und wirtschaftlichen Aufwand durchführbar als die Aufzeichnung von Sedimentationsbildern mit einer Kamera und deren Auswertung und eignet sich somit für eine einfachere, kostengünstigere Automatisierung des Verfahrens.

Gegebenenfalls hat die viskose Substanz auch die Funktion, eine Vernetzung bei erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion erst zu ermöglichen, z. B. durch Zusatz geeigneter Stoffe, die abstoßende Kräfte unter den Trägern abschwächen. Ein weiteres Beispiel ist der Zusatz von Coombsserum zur viskosen Substanz zum Nachweis inkompletter Antikörper, die andernfalls keine Agglutination der Träger-Erythrozyten hervorrufen.

Die Viskosität der Substanz ist so zu wählen, daß eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer sichtbaren, flächigen Agglutination der Träger führt. Dies kann insbesondere von der Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung und von der abstoßenden Wirkung der Träger abhängen. Bei schwacher Antigen-Antikörper-Bindung ist in der Regel eine höhere Viskosität erforderlich als bei einer starken Bindung. Das Verfahren hat jedoch den Vorteil, daß es prinzipiell für sämtliche Reaktionsstärken geeignet ist.

Insgesamt sollten die Reaktionsbedingungen, d. h. Viskosität der viskosen Substanz, Konzentration der Antigene bzw. Antikörper und der spezifischen Bindungspartner, Umgebungstemperatur und dergleichen, so gewählt sein, daß bei einer positiven Antigen-Antikörper-Reaktion eine Agglutination der Träger vorliegt. Die jeweiligen Bereiche

hängen insbesondere von der zu untersuchenden Reaktion ab. Dazu kann des weiteren vorteilhaft sein, die Probe nach dem Zusammenfügen der Reagenzien bei geeigneter Temperatur für einige Zeit zu inkubieren, damit sich das Sedimentationsbild ausbildet.

Die viskose Substanz kann ein Gel oder eine Suspension oder eine Dispersion inerter Partikel sein. Eine Reaktion der viskosen Substanz mit der Testflüssigkeit sowie weiteren zugefügten Flüssigkeiten sollte vermieden werden. Der viskosen Substanz können jedoch Stoffe beigelegt sein, welche auf die Agglutinationsreaktion Einfluß nehmen, so z. B. auch der spezifische Bindungspartner des nachzuweisenden Antikörpers oder Antigens oder Anti-IgG.

Die Flüssigkeit bzw. die Flüssigkeiten sollten blasenfrei der viskosen Substanz zugefügt werden, was beim vollautomatisch durchgeführten Verfahren durch eine Pipettiervorrichtung mit geeigneter mechanischer Steuerung, z. B. einen Pipettierroboter erreicht werden kann.

Ist die viskose Substanz ein Gel, so weist dieses vorzugsweise eine Gelstärke von wenigstens  $0,01 \text{ g/cm}^2$  auf. Für Anwendungen z. B. in der Blutgruppenbestimmung besonders bevorzugt ist eine Gelstärke im Bereich von  $0,05 \text{ g/cm}^2$  bis  $4000 \text{ g/cm}^2$ , vorzugsweise zwischen  $5 \text{ g/cm}^2$  und  $55 \text{ g/cm}^2$ , besonders bevorzugt zwischen  $20 \text{ g/cm}^2$  und  $30 \text{ g/cm}^2$ .

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist das Gel ein organisches Gel ist, insbesondere Agarose und/oder Gelatine. Diese Gele haben den Vorteil, daß sie sehr leicht anzusetzen sind, insbesondere in Verbindung mit Wegwerfmikrotiterplatten. Sie lassen sich des weiteren gut lagern, sind stabil und kurzfristig relativ unempfindlich gegenüber Änderungen der Umgebungstemperatur. Insbesondere mit Agarose einer Gelstärke von etwa 26 bis  $30 \text{ g/cm}^2$  wurden bei der Durchführung von Serumgegenproben zur Blutgruppenbestimmung gute Ergebnisse erzielt.

Derart mit Agarose präparierte Mikrotiterplatten lassen sich gekühlt einige Monate lagern. Auch die fertig präparierten Proben lassen sich gekühlt einige Wochen lagern, wobei die Reaktionsbilder stabil bleiben. Die Reaktionsergebnisse können somit auch längere Zeit nach Durchführung des Tests zur Kontrolle herangezogen werden.

Besteht die viskose Substanz aus inerten Partikeln als Suspension oder Dispersion in einem Medium, ist es vorteilhaft, wenn die inerten Partikel einen Durchmesser von etwa 10 bis 200 Mikrometer haben. Bei dieser Partikelgröße ist das Anlagern bzw. Halten von agglutinierten Trägern gegeben, während nicht agglutinierte Träger zwischen den Partikeln zu Boden sinken können. Das Verhältnis von Partikeln zu Medium sollte etwa so gewählt sein, daß die Partikel weitgehend dicht gepackt sind. Vorzugsweise bestehen die inerten Partikel aus Glas, insbesondere Quarzglas, oder polymeren Kunststoffen: Quarzglas oder Latexpartikel sind in einer Vielzahl von Korngrößen günstig erhältlich und extrem reaktionsträge.

Die Träger, an welche die nachzuweisenden Antigene bzw. Antikörper oder die spezifischen Bindungspartner gebunden sind, sind vorzugsweise Erythrozyten, Leukozyten, Blutplättchen oder Latex-Partikel. Die Latex-Partikel können zur einfacheren optischen Auswertung sichtbar gefärbt oder fluoreszenz-markiert sein. Die Konzentration der Träger in der Reaktionsflüssigkeit ist so zu wählen, daß das Agglutinat mit der gewählten optischen Detektionsmethode zuverlässig detektierbar ist.

Erfindungsgemäß wird das Sedimentationsbild optisch durch Aufsicht von etwa oben oder unten auf das Reaktionsgefäß ausgewertet. Falls von unten gemessen wird, muß das Mikroreaktionsgefäß transparent sein. Es ist vorzugsweise auch transparent, falls von oben ausgewertet wird, um den

Kontrast der Träger zum Hintergrund zu erhöhen. Durch die unterschiedlichen Gefäßquerschnitte im oberen Bereich der viskosen Substanz und in deren unterem Bereich bzw. im Bereich des Gefäßbodens wird im Falle einer Agglutination ein flächiger "Teppich" bzw. "Rasen" aus vernetzten Trägern erzeugt, während sich die Träger in einem in der Aufsicht kleineren Bereich ansammeln, wenn keine Agglutination erfolgt. Die Antigen-Antikörper-Reaktion kann somit optisch sehr einfach detektiert werden durch Messung der räumlichen Ausdehnung der Ansammlung der Träger. Das Sedimentationsbild kann visuell durch eine Bedienperson oder automatisch auf photometrischem Weg oder videogesteuert analysiert werden. Da die Träger-Ansammlung im wesentlichen von oben oder unten vermessen wird, ist eine besonders gute Automatisierbarkeit des Verfahrens gegeben. Insbesondere Mikrotiterplatten mit einer Mehrzahl von Mikroreaktionsgefäßen, die in einer Ebene angeordnet sind, lassen sich in Aufsicht von oben oder unten auf die Platte besonders gut in einem Arbeitsgang auswerten.

Die Deutlichkeit des sichtbaren bzw. detektierbaren Reaktionsergebnisses hängt unter anderem von der gewählten Gefäßform ab. Daher ist es vorteilhaft, wenn die Form des Gefäßes, zumindest im Bereich der viskosen Substanz, sich konisch verjüngend gewählt ist, z. B. eine Vertiefung einer Spitzboden-Mikrotiterplatte ist. Gute Ergebnisse werden allgemein erzielt, wenn die Querschnittsfläche des Gefäßes im Bereich der Füllhöhe der viskosen Substanz wenigstens das Vierfache der Querschnittsfläche des Gefäßes im Bereich unterhalb der viskosen Substanz beträgt.

Vorzugsweise erfolgt die Analyse, ob in einem Mikroreaktionsgefäß eine Antikörper-Antigen-Reaktion stattgefunden hat, photometrisch, indem die Absorption des in der Vertiefung enthaltenen Gemischs entlang einer vorbestimmten Linie gemessen und aufgezeichnet und das so ermittelte örtliche Absorptionsprofil ausgewertet wird. Diese Auswertemethode ist gut für die Auswertung einer Vielzahl von Proben, z. B. einer Mikrotiterplatte, in einem Arbeitsgang und damit in einer automatisierten Form des Verfahrens geeignet. Indem nur ein Absorptionsprofil gemessen wird, ist die zu speichernde und auszuwertende Datenmenge gegenüber beispielweise Videoauswertung verringert. Vorzugsweise wird dabei für eine feste Profillänge die Profillänge ermittelt. Eine positive bzw. negative Reaktion wird dann diagnostiziert, wenn die Profillänge unterhalb bzw. oberhalb eines vorbestimmten Wertes liegt. Diese Auswertemethode hat sich als besonders zuverlässig erwiesen.

Alternativ kann das Bild der Reaktionsgefäße auch mittels einer Video- oder CCD-Kamera oder dergleichen aufgezeichnet werden. Durch Bildanalyse können positive von negativen Reaktionen unterschieden werden. Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung der Reaktionsbilder ist die Fluoreszenzmarkierung der Träger und Detektion der räumlichen Emission von Fluoreszenzlicht.

Das Verfahren läßt sich vorteilhaft einsetzen zum Nachweis von Antigenen oder Antikörpern in einer Körperflüssigkeit und dabei insbesondere zur Bestimmung der Blutgruppe eines Spenders. Die Testflüssigkeit enthält dann eine Körperflüssigkeit, welche insbesondere Spendererythrozyten oder Blutserum oder Blutplasma enthält, die auf das Vorhandensein bestimmter Antikörper oder Antigene untersucht werden soll.

Das Verfahren läßt sich insbesondere einsetzen zum Nachweis von Blutgruppen-Antikörpern und damit zur Durchführung einer Serum-Gegenprobe oder eines Antikörper-Suchtests. Hier besteht grundsätzlich das Problem, daß jeder Spender einen individuellen Antikörper-Titer hat. Um mit herkömmlichen Verfahren eine zuverlässige Reaktion zu erhalten, müßte für jeden Spender eine individuelle Ver-

dünnung des Spenderserums erstellt werden, was insbesondere für die Automatisierung des Verfahrens hinderlich ist. Erfindungsgemäß enthält die Testflüssigkeit hierbei Blutserum, welches auf das Vorhandensein von bestimmten Blutgruppen-Antikörpern untersucht werden soll. Der Testflüssigkeit oder der viskosen Substanz wird eine Flüssigkeit zugefügt, die Test-Erythrozyten einer bekannten Blutgruppe enthält, welche als Träger mit spezifischen Bindungspartnern für den nachzuweisenden Antikörper, nämlich Antigenen, verbunden sind.

Vorzugsweise enthält dabei eine der Flüssigkeiten oder die viskose Substanz Albumin in einer Konzentration von wenigstens 0,01 mg/ml, vorzugsweise zwischen 0,2 mg/ml und 1 mg/ml oder ein anderes Supplement. Dieses dient zur Stabilisierung der Erythrozyten und zur Reduzierung der Abstoßung der Erythrozyten untereinander. Es wird eine bessere Vernetzung erreicht. Des weiteren wird durch Albuminzusatz die Diffusionsgeschwindigkeit der Erythrozyten durch das viskose Medium erhöht und damit die Zeit bis zur Ausbildung einer sichtbaren Reaktion verringert.

Bei der Blutgruppenbestimmung wird vorzugsweise etwa bei Raumtemperatur inkubiert. Es entfallen somit Inkubatoren, die eine konstante erhöhte Umgebungstemperatur herstellen. Die Automatisierung des Verfahrens wird somit weiter erleichtert.

Die Fig. 1 zeigt schematisch Reaktionsgefäße 1 im Längsschnitt, die z. B. Vertiefungen in Spitzboden-Mikrotiterplatten sind. Die Reaktionsgefäße 1 sind im oberen Bereich zylinderförmig und verjüngen sich im unteren Bereich konisch. Sie enthalten bis zu einer bestimmten Füllhöhe eine viskose Substanz 2, insbesondere ein Gel. Bedingt durch den Herstellungsvorgang, z. B. Schwenken des Gefäßes nach dem Einfüllen des flüssigen Gels und Adhäsion an der Gefäßwandung, ist die Oberfläche der Substanz 2 gekrümmt. Die Gelschicht sollte wenigstens so dick sein, daß die Wandung des Gefäßes im sich verjüngenden Bereich bedeckt ist. Andererseits bestimmt die Dicke der Gelschicht die Zeit bis Sichtbarmachung einer Reaktion mit. Daher ist eine gekrümmte Gelschicht unter Umständen vorteilhaft, die an allen Stellen möglichst dünn ist. Die dargestellten Größenverhältnisse sind nur schematisch.

Auf die viskose Substanz wird im Verfahrensschritt 1.2 ein bestimmtes Volumen der Testflüssigkeit 3 aufgebracht, welche Träger, Antigene und Antikörper enthält. Die Träger, die zum Nachweis einer Antigen-Antikörperreaktion optisch detektiert werden, sind hier stark übertrieben als Punkte dargestellt.

Fig. 1A zeigt die Situation kurz nach Zufügen der Testflüssigkeit 3. In den Fig. 1B bis 1D sind positive Reaktionen nach einer Sedimentationsphase (ggfs. auch nach Zentrifugieren) schematisch dargestellt. Die Träger bilden ein flächiges Agglutinat 4, 4' bzw. 4'', welches sich im oberen Bereich der Gelschicht 2 (Fig. 1B), im unteren Bereich der Gelschicht 2 (Fig. 1C) oder auf dem V-förmigen Boden des Reaktionsgefäßes 1 (Fig. 1D) anlagert.

Erfindungsgemäß wird das Sedimentationsbild in der Aufsicht etwa von oben oder unten aufgezeichnet. Die Fälle gemäß Fig. 1B bis 1D führen daher zu einem flächigen, rasenartigen Sedimentationsbild, welches mit einer positiven Reaktion identifiziert werden kann. In Fig. 1E ist eine negative Reaktion dargestellt. Der Schwerkraft/Zentrifugalkraft folgend; sammeln sich die nicht agglutinierten Träger am tiefsten Punkt des Gefäßes zu einem räumlich eng umgrenzten Gebilde 4''' an, das optisch leicht zu identifizieren und von den flächigen Agglutinaten gemäß Fig. 1B bis 1D zu unterscheiden ist.

Im folgenden wird ein Ausführungsbeispiel beschrieben: Zur Vorbereitung der Durchführung des Verfahrens werden

Mikroreaktionsgefäße mit der viskosen Substanz, die hier Agarose ist, präpariert. 53 Milligramm Agarose, z. B. Agarose Nr. A 7299 Typ XII Firma Sigma, werden auf 100 ml isotonische phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH-Wert ca. 7,45) bei einer Temperatur von etwa 95°C unter Rühren vollständig aufgelöst. Unter diesen Bedingungen weist das entstehende Gel etwa eine Gel-Stärke von 26,5 g/cm<sup>2</sup> auf. Bei Temperaturen von 50 bis 55°C wird in jede Kavität einer Spitzboden-Mikrotiterplatte etwa 20 µl der Gel-Lösung eingepipettiert. Die Platte wird sodann gleichmäßig geschüttelt und im Kühlschrank bei Temperaturen von etwa 4°C ausgießen gelassen. Das Gel bildet eine Schicht, welche die Gefäßinnenwandung bedeckt. Abgedeckt und gekühlt ist die so präparierte Platte wenigstens etwa zwei bis drei Monate haltbar.

Um die gewünschte Gel-Stärke zu variieren, kann 1 mg bis 2,5 g der genannten Agarose auf 100 ml Flüssigkeit aufgelöst werden.

Zur Durchführung des Verfahrens zur Blutgruppenbestimmung, hier der Serumgegenprobe, wird zunächst in vier Mischgefäße eine bestimmte Menge, z. B. 25 µl, im Verhältnis von 1 : 3,3 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünntem EDTA-Plasma, Citratplasma oder Serum eines Spenders eingepipettiert. Dieses Verdünnungsverhältnis ist an die photometrische Auswertung aufgrund der Eigenfärbung des Serums angepaßt; bei visueller oder Videoauswertung kann eine kleinere Verdünnung bis hin zum unverdünnten Serum bzw. Plasma genommen werden. Eine bestimmte Menge, z. B. 25 µl, 1,1%ige bis 4%ige Testerythrozyten der Gruppe A1, A2, B und 0, die hier die Träger der spezifischen Bindungspartner (Antigene A1, A2, B und 0) sind, werden auf die vier Mischgefäße verteilt und gemischt. Anschließend wird diese Testlösung in die Mikroreaktionsgefäße, hier die Kavitäten der Mikrotiterplatte, eingepipettiert. Das Verdünnungsmedium der Testerythrozyten enthält vorzugsweise Rinderalbumin in einer Konzentration von etwa 2 mg bis 50 mg, hier 26,4 mg auf 100 ml physiologische Kochsalzlösung NaCl. Alternativ kann das Patientenserum unverdünnt der verdünnten Test-Erythrozytenlösung zugesetzt werden, wodurch ein Arbeitsschritt entfällt.

Nach einer Inkubationszeit von etwa einer Stunde bei Raumtemperatur kann das Ergebnis photometrisch ausgewertet werden, indem die Absorption von Strahlung im Rot- bzw. Infrarotbereich als Funktion des Profilorbes gemessen wird.

Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde im vollautomatischen Verfahren eine Verweigerungsrate von etwa 1% bestimmt. Bei visueller Auswertung gelang eine noch bessere Identifizierung. Da handelsübliche Mikrotiterplatten in der Regel 96 Kavitäten aufweisen, läßt sich das Verfahren mit hohen Durchsatzwerten automatisieren.

Basierend auf dieser Grundlage kann ein Coombstest ohne Waschen aufgebaut werden, indem im Überschuß Anti-C3d und Anti-IgG zu dem Agarosegemisch zugesetzt wird. Das Gemisch aus Suchzelle (spezifisches Antigen und Träger-Erythrozyt) und Spenderserum wird auf das Gel eingepipettiert. Die irregulären Antikörper setzen sich an die Suchzelle, wobei allerdings eine Inkubation bei etwa 37°C erfolgen muß. Bei der Sedimentation werden die Suchzellen beispielsweise vom Anti-IgG in der Gelschicht festgehalten, wodurch es zu einer makroskopisch detektierbaren Vernetzung der Suchzellen kommt.

Des weiteren kann das Verfahren auch zum Nachweis von IgG-Molekülen verwendet werden, indem Protein A (Hüllenantigen von Staphylococcus aureus) oder Protein G (Hüllenantigen von Streptokokken) zugegeben wird. Diese haben eine hohe Affinität zu IgG-Molekülen. Zur Erfassung von irregulären IgM-Antikörpern kann Anti-IgM zugesetzt wer-

den.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei das Antigen bzw. der Antikörper oder der spezifische Bindungspartner an einen Träger gebunden ist und wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus Antigenen bzw. Antikörpern, den entsprechenden Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch detektierbar ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß
  - 1.1. ein Mikroreaktionsgefäß mit einem sich von oben nach unten verjüngendem Querschnitt verwendet wird, welches eine viskose Substanz enthält;
  - 1.2. ein vorbestimmtes Volumen der Testflüssigkeit dem Gefäß zugefügt wird, wobei der spezifische Bindungspartner entweder der Testflüssigkeit oder der viskosen Substanz zugesetzt ist, oder eine weitere Flüssigkeit, die den spezifischen Bindungspartner enthält, vor oder nach Zufügen der Testflüssigkeit dem Gefäß zugefügt wird;
  - 1.3. das Sedimentationsbild in Aufsicht etwa von oben oder unten auf das Gefäß ausgewertet wird, wobei ein flächiges Agglutinat von Antigenen bzw. Antikörpern, Bindungspartnern und Trägern auf eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion hinweist und eine räumlich weniger ausgedehnte Ablagerung von Trägern auf eine negative Reaktion hinweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die viskose Substanz ein Gel oder eine Suspension oder eine Dispersion inerte Partikel ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gel eine Gelstärke von wenigstens 0,01 g/cm<sup>2</sup> aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gel eine Gelstärke im Bereich von 0,05 g/cm<sup>2</sup> bis 4000 g/cm<sup>2</sup>, vorzugsweise zwischen 5 g/cm<sup>2</sup> und 55 g/cm<sup>2</sup>, besonders bevorzugt zwischen 20 g/cm<sup>2</sup> und 30 g/cm<sup>2</sup> aufweist.
5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Gel ein organisches Gel ist, insbesondere Agarose und/oder Gelatine.
6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die inerten Partikel einen Durchmesser von etwa 10 bis 200 Mikrometer haben.
7. Verfahren nach Anspruch 2 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die inerten Partikel aus Glas, insbesondere Quarzglas, oder vernetzten Polymeren oder Agarose bestehen.
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Träger Erythrozyten, Leukozyten, Blutplättchen, Latex-Partikel oder Agarose-Partikel sind.
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Gefäß im unteren Bereich konisch verjüngt.
10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Querschnittsfläche des Gefäßes im Bereich der Füllhöhe der viskosen Substanz wenigstens das Vierfache der Querschnittsfläche des Gefäßes im Bereich unterhalb der viskosen Substanz beträgt.

11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Spitzboden-Mikrotiterplatten verwendet werden und das Mikroreaktionsgefäß eine Vertiefung einer Spitzboden-Mikrotiterplatte ist.
12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Schritt 1.2 inkubiert wird, vorzugsweise bei Temperaturen von wenigstens 4°C, bevorzugt zwischen 10 und 37°C, und für wenigstens 15 Minuten, bevorzugt wenigstens 50 Minuten.
13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Gefäß nach dem Schritt 1.2 zentrifugiert wird.
14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse, ob in einem Mikroreaktionsgefäß eine Antikörper-Antigen-Reaktion stattgefunden hat, anhand des Sedimentationsbildes optisch durch eine Bedienperson oder automatisch mittels eines Photometers oder mittels einer Video- oder CCD-Kamera vorgenommen wird.
15. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse, ob in einem Mikroreaktionsgefäß eine Antikörper-Antigen-Reaktion stattgefunden hat, photometrisch erfolgt, indem die Absorption des in der Vertiefung enthaltenen Gemischs entlang einer vorbestimmten Linie gemessen und aufgezeichnet und das so ermittelte örtliche Absorptionsprofil ausgewertet wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß für eine feste Profillänge die Profillänge ermittelt wird und eine positive bzw. negative Reaktion diagnostiziert wird, wenn die Profillänge unterhalb bzw. oberhalb eines vorbestimmten Wertes liegt.
17. Verfahren zur Durchführung einer Serumgegenprobe zum Nachweis von Blutgruppen-Antikörpern und/oder Iso-Agglutininen nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Testflüssigkeit Blutserum enthält, welches auf das Vorhandensein von bestimmten Blutgruppen-Antikörpern untersucht werden soll, und der Testflüssigkeit oder der viskosen Substanz eine Flüssigkeit zugefügt wird, die Test-Erythrozyten einer bekannten Blutgruppe enthält, welche als Träger mit spezifischen Bindungspartnern für die nachzuweisenden Antikörper bzw. Iso-Agglutinine verbunden sind.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine der Flüssigkeiten oder die viskose Substanz Albumin in einer Konzentration von wenigstens 0,01 mg/ml enthält, vorzugsweise zwischen 0,2 mg/ml und 1 mg/ml.
19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Flüssigkeiten oder der viskosen Substanz Anti-IgG (Coombsserum) zugesetzt ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß etwa bei Raumtemperatur inkubiert wird.
21. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsbedingungen so gewählt sind, daß bei einer positiven Antigen-Antikörper-Reaktion eine Agglutination der Träger vorliegt.
22. Verwendung von Spitzboden-Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl von Vertiefungen, in welchen ein Gel oder eine Suspension inerte Partikel enthalten ist bzw. zugefügt wird, zur Durchführung eines Tests zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen durch De-

tektion einer Agglutinationsreaktion.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

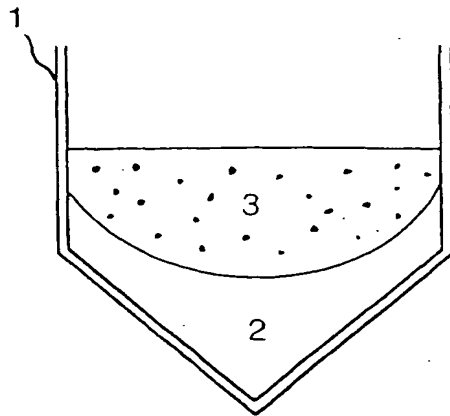


FIG. 1 A

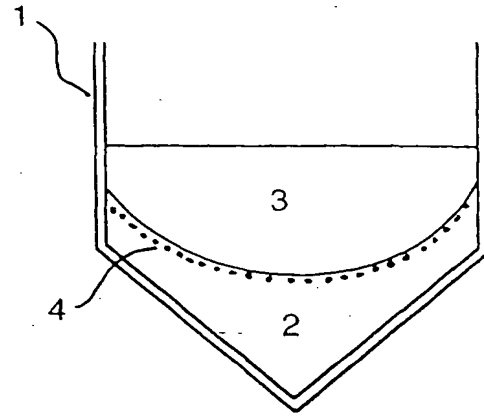


FIG. 1 B

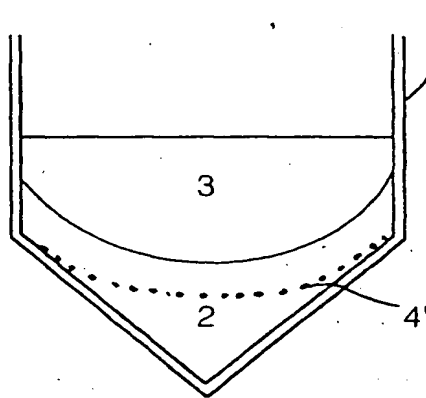


FIG. 1 C

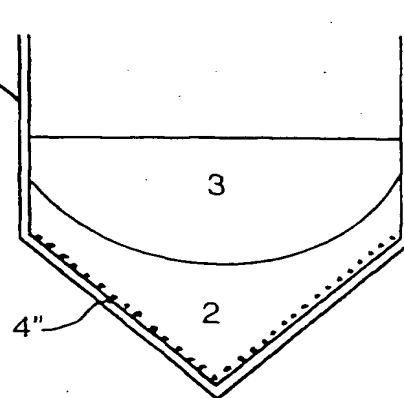


FIG. 1 D

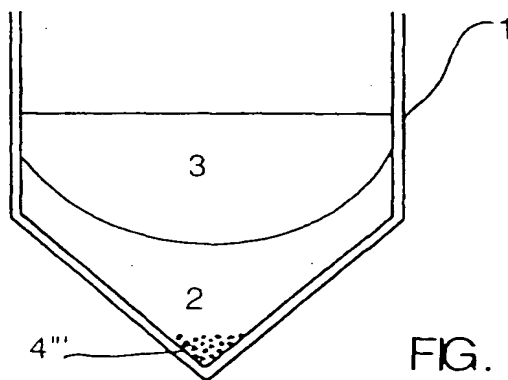


FIG. 1 E